

STRUKTURALNA OŠTEĆENJA KROMOSOMA I  
NJIHOVO ZNAČENJE KAO BIOINDIKATORA  
ZA IZLOŽENOST MUTAGENU

ĐURĐA HORVAT

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb*

*(Primljeno 24. X 1978)*

Prikazani su tipovi strukturalnih aberacija kromosoma i raspravljeno njihovo značenje kao bioindikatora izloženosti mutagenu. Spontane aberacije kromosoma, najčešće zastupane u obliku kromatidnog loma ili gapa, redovno su prisutne u zdravih neekspoziranih osoba. Kromosomska oštećenja kao što su bicentrici, prstenovi ili izmjene, rijetko ili nikada ne susrećemo u neekspoziranih ispitanika. Njihova prisutnost uvijek upućuje na izloženost mutagenu.

Suvremena naučno-tehnička revolucija uključuje intenzivan rast i razvoj kemijske industrije i obilno korištenje nuklearnom energijom. Direktno ili indirektno čovjek je izložen pojedinim kemijskim ili fizikalnim agensima, kao i njihovoj kombinaciji (1,2). Neke kemijske tvari, a gotovo svi tipovi ionizantnog zračenja, određene valne dužine ultravioletnog i nekih drugih zračenja, oštećuju DNK, tu esencijalnu makromolekulu žive stanice. Time se narušava normalna struktura kromosoma, kako u somatskim tako i u spolnim stanicama. O aberacijama kromosoma ljudskih somatskih stanica dokumentirano su izneseni brojni podaci, ovisno o vrsti mutagena, ali još nema posve jednoznačnih odgovora o biološkoj i kliničkoj značajnosti tih oštećenja. Epidemiološki podaci jasno upućuju na ozbiljnu povezanost između kromosomskih oštećenja u populaciji, izloženoj nekom mutagenu i incidenciji određenih tipova raka (3—6).

Mnogo je složeniji problem otkrivanje oštećenja kromosoma spolnih stanica čovjeka jer se zaključci mogu donositi tek naknadno, praćenjem kariotipskih abnormalnosti u djece, koja tada predstavljaju indeks oštećenja mejotskih kromosoma roditelja (7).

Zbog svega toga detekcija i analiza kromosomskih oštećenja čovjeka pokazala se u suvremenoj medicini, za sada, najboljim biološkim indikatorom izloženosti mutagenu.

Ideja za iskorištavanje strukturalnih aberacija kromosoma u biodozimetrijske svrhe nije nova. Moorchaedovom tehnikom (1960) *in vitro* kultivacije ljudskih limfocita i preparacijom metafaznih kromosoma započela je era studija mutagenog djelovanja, u prvom redu ionizantnog zračenja, a onda i niza kemijskih mutagena na čovjeka (8).

Radovima 1962. i 1964. god. *Bender* i suradnici prvi upozoravaju da se učestalost kromosomskih aberacija, nakon akutne izloženosti ionizantnom zračenju, može iskoristiti kao biološki dozimetar (9, 10). Mogle bi se, međutim, spomenuti stotine autora koji su u nepuna dva desetljeća proučavali kromosomska oštećenja osoba izloženih djelovanju mutagenih agenasa.

U kontroli izloženosti ionizantnom zračenju, u nizu zemalja se pored fizikalne dozimetrije obavlja i analiza na strukturalne aberacije kromosoma, kao biološki dozimetar. Takve se kontrole negdje provode premda nisu obavezne. Međutim, određene kategorije profesionalno izloženih osoba neminovno se prate na oba dozimetrijska načina (fizikalni i biološki) kako u istočnim tako i u zapadnim zemljama.

Našim Pravilnikom o stručnoj spremi, zdravstvenim uvjetima i zdravstvenim pregledima osoba koje smiju raditi s izvorima ionizacijskog zračenja (Službeni list SFRJ, br. 27/77) predviđa se također za pojedine skupine profesionalno izloženih osoba uz niz ostalih pretraga i obavezna kontrola na kromosomske aberacije.

Za dobivanje kromosomskih preparata pogodna su tkiva s visokom spontanom mitotičkom aktivnosti, kao npr. koštana srž ili jetra. Međutim, dostupnost i tehnika uzimanja tog celularnog materijala komplicirana je za široku primjenu pa je kratkotrajna *in vitro* kultivacija limfocita periferne krvi danas postala metodom izbora.

U cirkulaciji, limfociti su uglavnom u tzv.  $G_1$  ili presintetskoj fazi staničnog ciklusa (11).

*In vitro*, uz primjenu mitogenog stimulatora fitohemaglutinina, limfociti prelaze cijeli stanični ciklus: DNK presintetski ( $G_1$ ), DNK sintetski (S), DNK postsintetski ( $G_2$ ) i mitozu (M). Metafaza, kao stadij mitoze, najpogodnija je za studij vidljivih numeričkih i strukturalnih promjena kromosoma. Analiza numeričkih i strukturalnih aberacija kromosoma obavlja se u prvoj *in vitro* mitozu, tj. na staničnom materijalu, koji je fiksiran i obrađen nakon 45 do 48 sati *in vitro* kultivacije. Prijelazom limfocita *in vitro* do slijedećih mitozu jedan dio aberacija se gubi, odnosno moguće je formiranje novih aberantnih struktura. U tom se slučaju dobiva nerealna slika i stvara pogrešan zaključak (12).

Puna krv zdravog davaoca ozračivana *in vitro*, uz proveden uobičajeni postupak kultivacije limfocita i preparacije kromosoma, daje približno istu sliku kromosomskih oštećenja kao i kod ozračivanih osoba. S povišenjem doze zračenja linearno raste broj kromosomskih oštećenja. Dobiveni pravac predstavlja tzv. kalibracijski pravac, na osnovi kojeg je moguća približna procjena jednokratno primljene doze zračenja na cijelo tijelo (12). Takva ekstrapolacija moguća je samo kod viših i visokih doza zračenja (20 rada), dok niske doze ne podliježu linearnosti. U slučaju niskih doza kromosomska metoda omogućuje samo detekciju aberacija, ali ne i procjenu doze zračenja.

U slučaju profesionalne ekspozicije najčešće se radi o parcijalnom ozračivanju tijela i tada se može govoriti samo o tzv. ekvivalentu doze za cijelo tijelo. Analiza kromosoma daje podatak o »srednjem« biološkom učinku doze, koja se razlikuje od doze lokalno izmjerene fizikalnim dozimetrom (13).

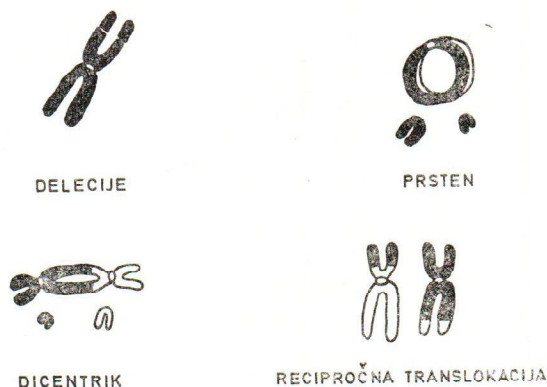
Analizirajući tipove strukturalnih aberacija kromosoma, neminovno se moramo ponovo dotaći staničnog ciklusa. Većina ljudskih somatskih stanica u određenom vremenu nije u stadiju diobe, nego se nalazi u tzv. interfazi, sa slabo vidljivim kromosomima. Efektivno udvostručavanje kromosomskog materijala odvija se prijelazom stanica iz G<sub>1</sub> stadija interfaze, u S period ili DNK sintetski, sve do G<sub>2</sub> stadija. Prema tome »G<sub>1</sub> stanice« sadržavaju jednolančani kromosomski materijal, dok G<sub>2</sub> posjeduju već dvočlani.

Sva klasifikacija induciranih, strukturalnih oštećenja kromosoma temelji se upravo na stadiju u kojem je oštećenje nastalo, u vrijeme jednočlane ili dvočlane DNK. Drugim riječima, procjenjuje se je li nadeo strukturalno oštećenje kromosoma rezultat ekspozicije *in vivo*, ili su promjene nastale *in vitro* i s ekspozicijom osobe mutagenu nemaju nikakve veze (7,11,13).

Poznato je da ionizantno zračenje može »proizvesti« oštećenja u svim stadijima intermitotskog ciklusa. Mnogi kemijski, a naročito biološki mutageni, mogu oštetiti humane kromosome u toku DNK sinteze (14). Pod pojmom biološki mutageni najčešće se misli na DNK i RNK viruse. Ekspozicija stanica virusu u toku G<sub>1</sub> faze nema učinka na ljudske kromosome, osim ako stanica nije bila na samom početku DNK sintetskog perioda. Tipična oštećenja izazvana virusima jesu pojedinačni kromatidni lomovi. Istina, postoji mogućnost da se tu formira i kromosomski tip oštećenja, ali u svakom slučaju prevladavaju kromatidne aberacije (15).

Opća klasifikacija induciranih kromosomskih aberacija kategorizira oštećenja na kromatidne i kromosomske aberacije, ovisno o tome je li oštećenje nastalo u staničnom stadiju s jednolančanom ili dvolančanom DNK (7,12). Najčešće viđena kromatidna aberacija je »gap«. To

### KROMOSOMSKE »G<sub>1</sub>« ABERACIJE



### KROMATIDNE »G<sub>2</sub>« ABERACIJE



Sl. 1. Kromosomske aberacije

oštećenje nije pravi lom i ne narušava kontinuitet kromosomske strukture, već je tzv. nebojiva, akromatska regija. U kulturi limfocita zdravih osoba susreće se u 2—4% analiziranih mitozu.

Slijedeća kromatidna lezija su pojedinačni kromatidni lomovi. Njihova je frekvencija u 1—2% metafaza neekspoziranih ljudi. Za razliku od prethodne lezije — gapa, gdje je zadržan kromatidni kontinuitet, kromatidni lom predstavlja diskontinuitet s distalnim kromatidnim fragmentom, koji je tu potpuno odvojen (16).

Tipski brojnija i istodobno mnogo složenija oštećenja su kromosomske aberacije. Njihovu nastajanje uvijek prethode primarni kromosomski lomovi. S morfološkog gledišta postoje dva osnovna tipa kromosomskih aberacija: delecije, koje nastaju nakon pojedinačnih lomova kromosomskih supstrukture, a očituju se kao slobodni fragmenti (minute, acentrici) i preostali dijelovi kromosoma; translokacije, koje nastaju ponovnim spajanjem odlomljenih dijelova, bilo na razini istog kromo-

soma (npr. prsten), ili između dva i više različitih lomljenih kromosoma (bicentrični, tricentrični). Upravo je ta skupina aberacija dobar pokazatelj izloženosti ionizantnom zračenju ako je identificirana u prvoj *in vitro* mitozu. Dicentrični i prstenasti kromosomi lako su uočljivi, a u običnoj populaciji sreću se manje od 1‰.

Formirani prstenasti kromosomi mogu, ali ne moraju sadržavati centromeru. Nastajanjem centričnog prstena preostaju i acentrični fragmenti, odnosno pri formiranju acentričnog prstena preostaje dio kromosoma s centromerom (17). Acentrični prstenovi i acentrični fragmenti gube se u toku stanične diobe jer im je nemoguća migracija u anafazi, tvoreći pritom tzv. mikronukleuse (18).

Poznati tip aberacija su tzv. »izmjene« (interchanges), koje mogu biti simetrične ili asimetrične, a predstavljaju izmjenu kromosomskog materijala između dva ili više kromosoma. Ponavljanje asimetričnih izmjena s multiplim lomovima omogućava formiranje policentričnih kromosoma.

Pulverizacija kromosoma je oštećenje, koje karakterizira niz uzastopnih kromosomskih lomova. Često dolazi u kombinaciji s nespiralizacijom kromosoma. Javlja se kao posljedica infekcije pojedinim tipovima virusa (19) ili nakon izloženosti nekim kemijskim agensima. Nikada se ne susreće u zdravih osoba.

Osim strukturalnih oštećenja kromosoma, u ljudskim somatskim stanicama susreću se i numeričke abnormalnosti. Aneuploidija je promjena broja kromosoma, bilo u pozitivnom ili negativnom smislu ( $46 + n$  ili  $46 - n$ ). Hipodiploidija ( $46 - n$ ) je najpoznatija forma aneuploidije s manjim brojem kromosoma od normalnog modalnog broja. Mnogo je rjeđi obrnut slučaj, tj. više kromosoma od modalnog broja ( $46 + n$ ).

Postoje dokazi da je u zdrava čovjeka aneuploidija somatskih stanica vezana na starost, a možda i spol. U starijih osoba povećava se učestalost hipodiploidije, a očituje se najčešće gubitkom jednog X kromosoma u žena, odnosno Y kromosoma u muškaraca. U osoba izloženih mutagenu aneuploidija može biti posljedica gubitka oštećenih kromosoma, koji nisu u toku mitoze jednako preneseni u obje stanice kćeri (20).

U kulturi limfocita susreću se i mitoze s multiplim brojem kromosoma. To je slučaj tzv. poliploidije koja nastaje zbog nedostatka normalnog anafaznog kretanja kromosoma, ili zbog defekta jezgrene membrane. Izuzetan oblik poliploidije su endoreduplikacije. Nastaju redukcijom kromosomske mase bez odvajanja sestrinskih kromatida. Stanica ima diploidan izgled, ali je svaki kromosom u duplikatu.

U zaključku možemo reći da se kromatidne aberacije — gapovi i lomovi, u malom broju, ali redovno susreću u zdravih osoba. To su tzv. spontane aberacije ako je izraz »spontane« prikladan. I one su vjero-

jatno posljedica djelovanja nekog neidentificiranog agensa, ili su nastale u toku manipulacije. U neeksponiranih osoba složena kromosomska oštećenja nalaze se izvanredno rijetko, a neka i nikada.

Najčešće se postavlja pitanje dopustivog postotka kromosomskih aberacija. Smatra se da je i u neeksponiranih osoba prisutno od 1 do 5% aberatnih mitozu (21). Međutim, takvo uopćavanje nije prihvatljivo jer treba uzeti u obzir i tipove oštećenja koji su prisutni. Nađu li se bicentrični i prstenasti kromosomi, pa makar i u znatno manjem postotku, tada oni očito upućuju na izloženost mutagenu.

Tom konstatacijom dolazi se do konačnog problema — što učiniti s osobom koja procentualno i tipski prekoračuje tzv. spontana, kromosomska oštećenja. Za sada je jedino prihvatljivo rješenje premještanje izložene osobe s postojećeg radnog mjesta na posao izvan domašaja štetnog agensa. Vrijeme izbivanja s redovnog radnog mjesta ovisi o više činilaca: vrsti mutagena, stupnju citogenetskog oštećenja, općem zdravstvenom stanju osobe, mjerama zaštite na radnom mjestu i drugom.

#### Literatura

1. Horvat, Đ.: Kromosomske aberacije u osoba profesionalno izloženih ionizantnom zračenju, Arh. hig. rada, 26 (1975) 139.
2. Horvat, Đ.: Citogenetska kontrola osoba s akutnim manifestacijama saturnizma, Sigurnost, (1976) 69.
3. Kitabatake, T., Sato, T., Takeuchi, S.: Frequency of prenatal X-ray examination and radiation risks in Japan, J. Radiat. Res., 17 (1976) 204.
4. Klener, V., Tuscany, R., Svoboda, V.: Vyskyt nádorových onemocneni a karyologicke nalezky u osob s dlouhodobym kostnim depem  $^{226}\text{Ra}$  a  $^{90}\text{Sr}$ , Vnitřní lékařství, 8 (1976) 767.
5. Stehney, A. F., Lucas, H. F. Jr., Rowland, R. E.: Survival times of women radium dial workers first exposed before 1930, International Symposium on the Late Biological Effects of Ionizing Radiation, 13—17 March 1978, Viena, Austria IAEA-SM-224/505.
6. Masanori, O.: Radiation effects on cancer mortality among A-bomb survivors 1950—72, J. Radiat. Res., 17 (1976) 262.
7. Bloom, A. D.: Induced Chromosomal Aberrations in Man, Advances in Human Genetics 3, Edited by H. Harris and K. Hirshborn, Plenum press New York — London 1974.
8. Moorhead, P. S., Nowell, P. C., Mellman, W. L., Battips, D. D., Hungerford, D. A.: Chromosome preparations of leukocyte cultures from peripheral blood, Exp. Cell Res., 20 (1960) 613.
9. Bender, M. A., Gooch, P. C.: Types and rates of X-ray induced chromosome aberrations in human blood, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 48 (1962) 522.
10. Bender, M. A.: Chromosome aberrations in irradiated human subjects, Ann. New York Acad. Sci., 114 (1964) 249.
11. Klačsterska, I., Natarajan, A. T., Ramel, C.: An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations, Hereditas, 83 (1976) 153.

12. *Tuscany, R.*: Zmeny v chromosomalnim obrazu lymfocitu z periferni krve jako biologicky indikator radiacni zateze osob, *Prac. Lek.*, 29 (1977) 231.
13. *Pohl-Ruling, J., Fiscer, P., Pohl, E.*: The low-level shape of dose response for chromosome aberrations Int. symp. on the late biol. effects of ionizing radiation, Viena, Austria, 13—17 March 1978.
14. *Horvat, Đ., Prpić-Majić, D.*: Cytogenetic and biochemical study of lead-exposed population, *Mut. Res.*, 53 (1978) 200.
15. *Nichols, W. W.*: Virus induced chromosome abnormalities, *Ann. Rev. Microbiol.*, 24 (1970) 479.
16. *Lubs, H. A., Samuelson, J.*: Chromosome abnormalities in lymphocytes from normal human subjects, *Cytogenetics*, 6 (1976) 402.
17. *Schleiermacher, E.*: Chromosome aberrations in mitoses and meiosis in vivo, *Arch. Toxicol.*, 28 (1971) 105.
18. *Schmid, W.*: The Micronucleus test for cytogenetic analysis, *Chem. Mutagens*, 4 (1976) 31.
19. *Nichols, W. W., Aula, P., Levan, A., Heneen, W., Norrby, E.*: Radioautography with tritiated thymidine in measles and Sendai virus induced chromosome pulverzations, *J. Cell Biol.*, 35 (1976) 257.
20. *Jacobs, P. A., Brown, C.*: Distribution of human chromosome counts in relation to age, *Nature*, 191 (1961) 1178.
21. *Aula P., Koskull H.*: Distribution of spontaneous chromosome breaks in human chromosomes, *Hum. Genet.*, 32 (1976) 143.

#### Summary

#### STRUCTURAL CHROMOSOME DAMAGES — BIOINDICATORS OF EXPOSURE TO MUTAGENS

Many chemical and physical agents damage normal chromosomal structures in somatic and sex cells in man. In the paper are discussed the types of damage according to the phase of the intermitotic cell cycle.

Ionizing radiation damages the genetic mass of the cell in all phases of the intermitotic cycle. Chemical and biological mutagens very often transform the structure of human chromosomes in the course of DNA synthesis. Depending on whether the damage has occurred in the cell phase with a single or a double stranded DNA structural aberrations are classified as chromatid or chromosomal.

The usual percentage of spontaneous aberrations, mainly breaks or gaps, is one to five per cent. They occur as a result of the *in vitro* conditions of cultivation, but to a smaller extent may also appear *in vivo*.

Chromosomal damages such as dicentric and ring chromosomes and exchanges are found only rarely or never in healthy nonexposed persons. Their presence is an indication of exposure to mutagens. The persons in whom significant structural chromosome aberrations have been detected should be removed — temporarily or permanently — from the range of the mutagenic agents.

*Institute for Medical Research and  
Occupational Health, Zagreb*

*Received for publication  
October 24, 1978.*